

IVD

Istruzioni per l'uso (italiano)

1 Destinazione d'uso

L'ampliCube STD Panel 2.1 LC è un test qualitativo in vitro per la rilevazione specifica del DNA di *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* (nonché della loro differenziazione) in campioni di urina (di preferenza urina primaria) o tamponi urogenitali di origine umana.

Da usare esclusivamente su LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Questo test non è da utilizzare su altri termociclatori Real-Time PCR.

2 Campo d'applicazione

Trichomonas vaginalis è un protozoo parassita anaerobico appartenente alla famiglia Trichomonadidae e trasmesso principalmente attraverso i rapporti sessuali. Negli uomini la malattia ha un decorso prevalentemente asintomatico, che può tuttavia evolvere in uretrite. Nelle donne, i sintomi si manifestano con infiammazione delle mucose degli organi genitali (vaginite da *Trichomonas*). Anche in questo caso può comparire interessamento dell'uretra con conseguente possibile infiammazione.

I batteri *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* appartengono alla famiglia dei Micoplasmici. L'infezione da micoplasma è una malattia molto comune sessualmente trasmissibile e altamente infettiva. Gli agenti patogeni si insediano spesso negli organi genitali senza danneggiare l'ospite, anche se in certi casi possono scatenare infiammazioni locali. I sintomi sono diversi a seconda della localizzazione dell'infiammazione (uretere, vescica, prostata, reni, bacinetti renali, vagina, tube, ovaie). I sintomi più comuni sono frequente stimolo a urinare, bruciore alla minzione, perdite giallastre (uretrite) e dolore nella regione renale. Negli uomini l'*U. urealyticum* è il patogeno dell'uretrite non gonorroica e della prostatite.

3 Principio del test

Il test è un sistema Real-Time PCR (reazione a catena della polimerasi in tempo reale), che utilizza primer specifici e sonde marcate per l'amplificazione e il rilevamento del DNA di *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*. Per assicurare che gli acidi nucleici isolati dal campione del paziente non contengano sostanze in grado di inibire la PCR, durante l'isolamento del DNA al campione viene aggiunto un controllo interno (IC). Tale IC viene amplificato e rilevato nella stessa determinazione PCR. In questo modo è possibile escludere risultati del test falsi negativi causati dall'inibizione della reazione PCR. L'IC consente al contempo di attestare l'estrazione degli acidi nucleici dal campione del paziente. Le sonde per il rilevamento del DNA specifico dell'agente patogeno sono marcate con i coloranti reporter FAM (*Trichomonas vaginalis*), HEX (*Mycoplasma hominis*), ATTO Rho12 (*Ureaplasma urealyticum*) e Cyan 500 (*Ureaplasma parvum*), le sonde per il rilevamento del controllo interno con ATTO 647N. In questo modo nella stessa porzione di reazione è possibile rilevare simultaneamente tutte le sequenze target.

Il valore Ct (*cycle threshold*) descrive la parte della curva in cui la fluorescenza aumenta per la prima volta in misura esponenziale rispetto al valore di fondo.

4 Reagenti

4.1 Contenuto della confezione

I reagenti contenuti in una confezione sono sufficienti per 50 determinazioni.

Ogni set di reagenti contiene:

P&P MIX	150 µl di mix di primer e campioni per <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> e controllo interno (coperchio di colore verde)
ENZYME	600 µl mix di enzimi (coperchio di colore bianco) Contiene DNA polimerasi. (Il componente è colorato di blu.)
CONTROL INT	250 µl di controllo interno (coperchio incolore)
CONTROL +	170 µl di controllo positivo (coperchio di colore rosso)
CONTROL -	2x 1800 µl di controllo negativo (coperchio di colore blu)

INSTRU	1 Istruzioni per l'uso
---------------	------------------------

4.2 Reagenti, materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation (LightCycler® 480, 5-Plex, articolo n° 50502)
- Estrazione degli acidi nucleici: si raccomandano i seguenti sistemi di estrazione degli acidi nucleici: sistema MagNA Pure®, Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) o kit alphaClean Mag RNA/DNA (MIKROGEN) con procedura su estrattore M32, M48 o M96 (Biocomma)
- Termociclatore Real-Time: LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Pellicole e piastre per PCR a 96 pozzetti: attenersi alle raccomandazioni del produttore del termociclatore per Real-Time PCR
- Micropipette con siringhe monouso con filtro da 10 µl, 20 µl, 100 µl e 1000 µl
- Miscelatore a vortice ad alta velocità (raccomandati 3200 giri/min)
- Mini-centrifuga
- Centrifuga per piastre
- Guanti monouso non talcati
- Blocco di raffreddamento

5 Conservazione e manipolazione

- ☞ Prima e dopo l'uso conservare i reagenti a una temperatura compresa tra -25°C e -18°C.
- ☞ Evitare la ripetizione delle operazioni di congelamento e scongelamento dei componenti (più di dieci volte). Si consiglia di separare i componenti del test dopo il primo scongelamento.
- ☞ Durante le fasi di lavoro conservare i reagenti in luogo fresco (da +2°C a +8°C).
- ☞ Durante l'esecuzione del test proteggere i componenti del kit dalla luce diretta del sole.
- ☞ Prima di iniziare il test scongelare completamente tutti i reagenti, miscelarli (brevemente con il miscelatore a vortice) e centrifugarli.
- ☞ Sulle confezioni è riportata una data di scadenza, oltre la quale decade la garanzia di qualità del prodotto.
- ☞ Il test deve essere eseguito esclusivamente da personale addestrato e autorizzato.
- ☞ In caso di modifiche sostanziali al prodotto oppure alle modalità di impiego da parte dell'utente, l'utilizzo può risultare non conforme alla destinazione d'uso stabilita da MIKROGEN.
- ☞ La contaminazione incrociata può condurre a risultati errati. Aggiungere con precauzione i campioni del paziente e i controlli, prestando attenzione che le porzioni di reazione non trabocchino nelle altre cavità.

6 Avvertenze e prescrizioni di sicurezza

- ☞ Utilizzare solo per la diagnostica in vitro.
- ☞ Tutti i campioni del paziente devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.
- ☞ Per l'intera durata dell'esecuzione del test indossare idonei guanti monouso.
- ☞ Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con idonee sostanze disinfettanti oppure devono essere smaltiti in conformità con le prescrizioni igieniche applicabili. Osservare le indicazioni del produttore relative alla concentrazione e ai tempi di incubazione.
- ☞ Non sostituire né mescolare i reagenti con reagenti di kit di lotti diversi, altri kit PCR MIKROGEN o con reagenti di altri produttori.
- ☞ Prima di eseguire il test, leggere e seguire scrupolosamente tutte le istruzioni per l'uso. Eventuali discrepanze con il protocollo di test riportato nelle istruzioni per l'uso possono determinare risultati errati.

7 Prelievo dei campioni e preparazione dei reagenti

7.1 Materiale e preparazione del campione

Il materiale di base per ampliCube STD Panel 2.1 LC è il DNA, estratto da campioni di urina (di preferenza urina primaria) o tamponi urogenitali di origine umana. La qualità della preparazione degli acidi nucleici influenza il risultato del test. È necessario accertarsi che il metodo di estrazione scelto sia compatibile con la tecnologia Real-Time PCR.

7.2 Estrazione degli acidi nucleici

Estrarre gli acidi nucleici dal campione del paziente e dal controllo negativo (NC). Si consiglia un volume iniziale di estrazione di 200 µl e un volume di eluizione di 50 µl o 100 µl a seconda del sistema di estrazione. Seguire le istruzioni fornite dal produttore del kit di estrazione.

1. Scongela il controllo interno (IC) (coperchio incolore) e il controllo negativo (NC) (coperchio di colore blu).
Assicurarsi che l'IC e l'NC siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare rapidamente l'IC e l'NC con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!
2. Durante l'estrazione di ogni campione del paziente e dell'NC, aggiungere 5 µl di IC. L'IC deve essere aggiunto al mix di tamponi di lisi dei campioni e non direttamente al materiale campione.
3. Estrarre i campioni del paziente e l'NC. (Nota: l'NC non può essere utilizzato senza estrazione nella PCR!)
4. Il controllo positivo non viene estratto.

Per la valutazione delle prestazioni sono stati usati i seguenti sistemi di estrazione degli acidi nucleici:

Sistema di estrazione	Volume campione	Volume eluizione
MagNA Pure® 24 (Roche) Total NA Isolation Kit	200 µl	50 µl
M96 Nucleic Acid Extraction Systems (biocomma) alphaClean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN)	200 µl	100 µl
M32 Nucleic Acid Extraction Systems (biocomma) alphaClean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN)	200 µl	100 µl

Se si desidera utilizzare altri metodi di estrazione rispetto a quelli indicati al punto 4.2 e per la valutazione delle prestazioni, si prega di rivolgersi al produttore per verificarne la compatibilità.

7.3 Preparazione del Master mix

1. Scongela il mix di Primer & Probe (coperchio di colore verde) e il mix di enzimi (coperchio di colore bianco). Durante questa operazione proteggere i reagenti dalla luce.
Assicurarsi che i reagenti siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare i reagenti con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!
2. Preparare il Master mix attenendosi al seguente schema di pipettaggio:

Componenti	Master mix per 1 reazione
Mix di Primer & Probe	3 µl
Mix di enzimi	12 µl
Volume complessivo	15 µl

3. Miscelare tutto il Master mix con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente.
4. Preparare 15 µl di Master mix per ogni reazione PCR.

7.4 Preparazione della reazione PCR

1. Scongela il controllo positivo (PC) (coperchio di colore rosso).
Assicurarsi che i reagenti siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare i reagenti con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!

Componenti	1 reazione
Master mix da 7.3	15 µl
Eluato campione o NC oppure il PC	10 µl

2. Pipettare 10 µl di eluato campione in 15 µl di Master mix.
3. Pipettare 10 µl di controllo positivo (non preparato) in 15 µl di Master mix.
4. Pipettare 10 µl di eluato del controllo negativo in 15 µl di Master mix.

Ogni ciclo deve contenere un controllo positivo e uno negativo!

Chiudere la piastra PCR con una pellicola ottica adesiva.



Le piastre PCR devono essere miscelate nel miscelatore a vortice per almeno 5 sec. al numero di giri massimo e poi centrifugate brevemente.

8 Programmazione del termociclatore Real-Time

L'ampliCube STD Panel 2.1 LC è stato valutato con lo strumento LightCycler® 480 Instrument II (Roche) e sviluppato esclusivamente per la procedura su un LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

8.1 Impostazione dei canali di rilevamento

	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Controllo interno (IC)
Colore	blu	verde	giallo	arancione	rosso
Colorante reporter	Cyan 500	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Eccitazione	440 nm	465 nm	533 nm	533 nm	618 nm
Emissione	488 nm	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Quencher	[nessuno]	[nessuno]	[nessuno]	[nessuno]	[nessuno]

Le indicazioni relative alle lunghezze d'onda dei canali di rilevamento si riferiscono al LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

In caso d'impiego del LightCycler® 480 Instrument II (Roche) è necessario utilizzare un kit Color Compensation (5-Plex, articolo n° 50502) fornito da MIKROGEN.

8.2 Programma PCR

Retrotrascrizione	50°C	8 min
Denaturazione	95°C	3 min
Amplificazione	45 cicli	
• Denaturazione	95°C	10 sec
• Annealing/Estensione	60°C	45 sec

Per informazioni di base sulla programmazione del LightCycler® 480 Instrument II (Roche) fare riferimento alle istruzioni del termociclatore. Per informazioni specifiche sulla programmazione del termociclatore Real-Time PCR utilizzando l'ampliCube STD Panel 2.1 LC, contattare il produttore.

9 Risultati

9.1 Validazione

1. Il controllo negativo deve rimanere al di sotto del *valore soglia (threshold)*. Il controllo interno (IC) nel controllo negativo deve mostrare un andamento positivo della curva. Se il controllo negativo mostra un andamento positivo della curva (contaminazione) o se l'IC nel controllo negativo non è valido, il test non è valutabile.
2. Il controllo positivo deve mostrare un andamento positivo della curva.
Il valore Ct del controllo positivo deve essere < 33. Un controllo positivo al di fuori di questo intervallo indica un problema nell'amplificazione.
3. Il controllo interno (IC) in campioni negativi deve mostrare un andamento positivo della curva.
Il segnale dell'IC di un campione del paziente deve essere confrontato con il segnale dell'IC nel controllo negativo estratto. Una differenza di > +3 per il valore Ct dell'IC di un campione rispetto all'IC del controllo negativo oppure la mancanza di un segnale IC nel campione possono indicare un'inibizione significativa della reazione PCR. In questi casi un risultato negativo del test non è valido.

9.2 Analisi

L'analisi dei dati può aver luogo con il software del termociclatore per PCR o con una soluzione software appositamente supportata da MIKROGEN per l'analisi automatizzata della PCR e la relativa interpretazione. In caso d'impiego di un LightCycler® 480 Instrument II (Roche), la valutazione può essere eseguita con il metodo *Abs Quant/2nd Derivative Max* (raccomandato) o con il metodo *Abs Quant/Fit Points*. Ulteriori informazioni e relative istruzioni sono disponibili a richiesta presso MIKROGEN.

I segnali di amplificazione superiore al valore *soglia* vengono valutati come risultati positivi. I campi vuoti nella tabella sono considerati un risultato negativo.

Colore	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Controllo interno (IC)
blu	positivo				
verde		positivo			
giallo			positivo		
arancione				positivo	
rosso					positivo*

* In caso di segnali positivi nei canali di rilevamento degli agenti patogeni, il segnale del controllo interno non è necessario per l'interpretazione del test. Un elevato carico di patogeni nel campione del paziente può condurre a un segnale minore o inesistente per il controllo interno.

10 Limiti del metodo, limitazioni

- I risultati dei test devono essere sempre considerati nel contesto del quadro clinico del paziente. Le conseguenze terapeutiche dei rilevamenti devono essere determinate in considerazione dei dati clinici.
- Un risultato negativo del test *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis* e/o *Ureaplasma urealyticum/parvum* non può escludere un'infezione dai rispettivi agenti patogeni.

11 Caratteristiche delle prestazioni

11.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state determinate sulla base di campioni del paziente definiti positivi e negativi.

Tabella 1: Campioni clinici definiti positivi

ampliCube STD Panel 2.1 LC	<i>Trichomonas vaginalis</i> (n=33)	<i>Mycoplasma hominis</i> (n=5)	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (n=6)	<i>Ureaplasma parvum</i> (n=19)
Negativo	0	0	0	0
Positivo	33	5	6	19
Sensibilità [%]	100	100	100	100
95% CI* [%]	89,57 – 100	56,55 – 100	60,97 – 100	83,18 – 100

* CI = intervallo di confidenza (ingl. confidence interval)

Tabella 2: Campioni clinici definiti negativi

ampliCube STD Panel 2.1 LC	<i>Trichomonas vaginalis</i> (n=66)	<i>Mycoplasma hominis</i> (n=66)	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (n=66)	<i>Ureaplasma parvum</i> (n=66)
Negativo	66	66	66	66
Positivo	0	0	0	0
Specificità [%]	100	100	100	100
95% CI* [%]	94,50 – 100	94,50 – 100	94,50 – 100	94,50 – 100

* CI = intervallo di confidenza (ingl. confidence interval)

11.2 Sensibilità analitica

Il limite di rilevabilità (LoD) dell'ampliCube STD Panel 2.1 LC è stato determinato con una serie di diluizioni a concentrazioni note di DNA genomico purificato (standard Vircell) sul LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Il limite di rilevabilità del 95% è stato definito mediante analisi di regressione probit con il software CombiStats™ versione 6.0 (Consiglio d'Europa).

Tabella 3: Limite di rilevabilità (LoD)

	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
LoD Limite di rilevabilità del 95% [copie/PCR]	6,41	15,50	5,64	8,90
95% CI* [copie/PCR]	2,90 – 25,28	9,53 – 37,67	3,28 – 18,69	4,80 – 27,51

* CI = intervallo di confidenza (ingl. confidence interval)

11.3 Specificità analitica

La ricerca in BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) ha dimostrato che le sonde e i primer selezionati dell'ampliCube STD Panel 2.1 LC rilevano in modo specifico gli agenti patogeni selezionati. È stata inoltre determinata la specificità attraverso l'esame del DNA/RNA genomico di ulteriori batteri e virus patogeni per l'uomo.

Tabella 4: Batteri e virus testati per mostrare la specificità analitica dell'ampliCube STD Panel 2.1 LC.

Batteri	Virus
<i>Aerococcus urinae</i>	Adenovirus
<i>Campylobacter coli</i>	Citomegalovirus
<i>Campylobacter jejuni</i>	Virus dell'herpes simplex 1
<i>Candida albicans</i>	Virus dell'herpes simplex 2
<i>Candida glabrata</i>	Parotite
<i>Candida krusei</i>	Virus della varicella zoster
<i>Candida parapsilosis</i>	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	
<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Clostridium difficile</i>	
<i>Clostridium perfringens</i>	
EHEC stx+	
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Providencia stuarti</i>	
<i>Treponema pallidum</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Nessuno di questi campioni ha mostrato un segnale positivo. Le sonde e i primer utilizzati nell'ampliCube STD Panel 2.1 LC non hanno mostrato reazioni crociate con gli agenti patogeni elencati in Tabella 4. Il controllo interno (IC) è stato valido in tutti i test.

11.4 Equivalenza di diversi materiali campione

È stato determinato il coefficiente di variazione (CV) del valore Ct tra acqua ed estratto del rispettivo materiale campione dopo aggiunta di DNA genomico purificato (standard Vircell) in concentrazione nota.

Tabella 5: Equivalenza di diversi materiali campione

	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
CV [%] (urina, H ₂ O)	0,57	0,95	1,24	0,75
CV [%] (tamponi, H ₂ O)	0,73	1,11	1,32	0,81

Il coefficiente di variazione (CV), basato sul valore Ct (*cycle threshold*) tra acqua ed estratti di DNA (raccolti dai diversi materiali campione), è stato per tutti i geni target $\leq 1,32\%$.

12 Riferimenti bibliografici

- M. Biernat-Sudolska et al. (2006): Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma respiratory tract infections in newborns. Acta Biochimica Polonica, October 2006; Vol 53 No.3/2006 pp: 609-612
- M. Bradic et al (2017): Genetic indicators of drug resistance in the highly repetitive genomes of *Trichomonas vaginalis* and other trichomonads. Genome Biol Evol. 2017 Jun; 9(6): pp: 1658–1672
- R. L Dunne et al (2003): Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell Research (2003); 13(4): pp: 239-249
- T. Edwards et al (2014): *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. Crit Rev Microbiol, Early Online: 1–12
- M. Hobbs et al (2013): Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection.
- C. Huang et al (2015): Mycoplasma and ureaplasma infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis, Andrology 3.5, pp: 809-816
- R. D. Kirkcaldy et al (2012): *Trichomonas vaginalis* Antimicrobial Drug Resistance in 6 US Cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. Emerging Infectious Diseases Vol. 18, No. 6, June 2012, pp: 939-943
- B. Larsen et al (2010): Mycoplasma, Ureaplasma, and Adverse Pregnancy Outcomes: A Fresh Look. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, Volume 2010, Article ID 521921, pp: 1-7
- H. Moi et al (2015): Management of non-gonococcal urethritis, BMC infectious diseases 15.1, pp: 1-7
- T. E. Paulish-Miller et al (2014): *Trichomonas vaginalis* Metronidazole Resistance Is Associated with
- Sex Transm Infect. 2013 September; 89(6): pp: 434–438
- Single Nucleotide Polymorphisms in the Nitroreductase Genes *ntr4Tv* and *ntr6Tv*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 2938–2943 May 2014 Volume 58 Number 5
- J. R. Schwebke et al (2004): Trichomoniasis. Clinical Microbiology Reviews, Oct. 2004, pp. 794–803

14. D. Shey Nsagha et al (2015): The Epidemiology of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* and *Candida albicans* Co- Infections in Women Attending the Yaounde University Teaching Hospital. American Journal of Epidemiology and Infectious Disease, 2015, Vol. 3, No. 2, pp: 28-31

Su richiesta saremo lieti di inviarvi ulteriore documentazione.

13 Spiegazione dei simboli

	Contiene reattivi sufficienti per <n> determinazioni Numero degli inserimenti
P&P MIX	Mix di Primer & Probe
ENZYME	Mix di enzimi
CONTROL INT	Controllo interno
CONTROL +	Controllo positivo
CONTROL -	Controllo negativo
INSTRU	Istruzioni per l'uso
	Osservare le istruzioni per l'uso
CONT	Contenuto, contiene
IVD	Test in vitro
LOT	Numero di lotto/versione
REF	Numero di catalogo
	Utilizzare entro Data di scadenza
	Conservare a una temperatura compresa tra x°C e y°C
	Produttore

14 Dati sul produttore e sulla versione

ampliCube STD Panel 2.1 LC		Articolo n° 50312
Istruzioni per l'uso valido da		GAACSD21L2IT 2023-04
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
		



GAACSD21L2